

УДК 616-008.9:577.121.7

*М.Я. Ходос¹, Я.Е. Казаков², М.Б. Видревич¹, Х.З. Брайнина¹***МОНИТОРИНГ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА
В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ**¹ Уральский государственный экономический университет, г. Екатеринбург, Российская Федерация;² АО «Медицинские технологии», г. Екатеринбург, Российская Федерация*M.Ya. Khodos¹, Ya.E. Kazakov², M.B. Vidrevich¹, Kh.Z. Brainina¹*
MONITORING OF OXIDATIVE STRESS IN BIOLOGICAL OBJECTS¹Ural State University of Economics, Yekaterinburg, Russia²Joint-stock company “Medical Technologies”, Yekaterinburg, Russia

Резюме. Развитие методов диагностики общего состояния здоровья, которые могут быть реализованы в форматах *on-site* и *in-situ* для нужд массового скрининга населения, а также использованы в home clinic и телемедицине, является весьма актуальной задачей. Общим преддиагностическим показателем наличия патологий может служить наличие и уровень окислительного стресса (ОС).

Основным условием понимания и оценки роли ОС в патогенезе различных заболеваний является возможность его мониторинга, что весьма существенно как для клинических исследований, так и для выбора терапевтических средств, контроля их качества и оптимизации проводимой терапии. Сложность биологических объектов и быстрое изменение их состава после отбора пробы, многообразие соединений различной химической природы, обладающих окислительными и антиокислительными свойствами, делают задачу оценки ОС крайне нетривиальной. Ситуация осложняется отсутствием единого термина и сопоставимых единиц выражения концентрации и антиокислительных свойств соединений или комплекса соединений.

В обзоре рассмотрены известные методы определения окислительной/антиокислительной активности (свободных радикалов и соединений-антиокислителей) биологических объектов, общий подход к анализу сложных матриц, заключающийся в поиске общих параметров, существенных для исследуемой системы и разработки методов их определения.

Показано, что в качестве критерия ОС предпочтительно использовать интегральную антиокислительную активность пробы, а для её мониторинга — простой и доступный метод потенциометрии с медиаторной системой.

Ключевые слова: окислители, антиокислители, окислительный стресс, интегральная антиокислительная активность, биологические объекты

Abstract. The development of methods for diagnostics of the general state of health that can be implemented in on-site and in-situ formats for the needs of mass screening of the population, and also used in home clinic and telemedicine is a very urgent task. Presence and level of oxidative stress (OS) might serve as general pre-diagnostic indicator of pathology state.

The main condition for understanding and assessing the role of oxidative stress (OS) in the pathogenesis of various diseases is the possibility of its monitoring, which is very important both for clinical studies and for selecting therapeutic agents, monitoring their quality and optimizing the therapy. The complexity of biological objects and the rapid change in their composition after sampling, the variety of compounds of different chemical nature, possessing oxidative and antioxidant properties, make the task of the OS estimating extremely nontrivial. The situation is complicated by the absence of a single term and comparable units of concentration and antioxidant properties of compounds or a complex of compounds.

In the review known methods for the determination of oxidant / antioxidant activity (free radicals and antioxidant compounds) of biological objects, general approach to analysis of complex matrices — search for general parameters essential for the investigated system and the development of methods for determining them are considered.

It is shown that it is preferable to apply the integral antioxidant activity of the sample as an OS criterion, and a simple and accessible method of potentiometry with a mediator system for OS monitoring.

Keywords: oxidants, antioxidants, oxidative stress, integral antioxidant activity, biological objects

Конфликт интересов отсутствует.

There is no conflict of interest.

Контактная информация автора, ответственного за переписку:

Ходос Марк Яковлевич
hdm@usue.ru

Contact information of the author responsible for correspondence:

Mark Ya. Khodos
hdm@usue.ru

Дата поступления 15.08. 2017

Received 15.08.2017

Образец цитирования:

Ходос М.Я., Казаков Я.Е., Видревич М.Б., Брайнина Х.З. Мониторинг окислительного стресса в биологических объектах. Вестник уральской медицинской академической науки. 2017, Том 14, №3, с. 262–274, DOI: 10.22138/2500-0918-2017-14-3-262-274

For citation:

Khodos M.Ya., Kazakov Ya.E., Vidrevich M.B., Brainina Kh.Z. Monitoring of oxidative stress in biological objects. Vestn. Ural. Med. Akad. Nauki = Jour. Ural Med. Acad. Science. 2017, Vol. 14, no. 3, pp. 262–274. DOI: 10.22138/2500-0918-2017-14-3-262-274 [In Russ.]

На 18-м международном конгрессе по антиоксидантам Международного Общества Антиоксидантов и Здоровья (ISANH), состоявшемся в Бейруте 3–4 мая 2017 [1] основное внимание было уделено рассмотрению проблемы возникновения и роли оксидантного стресса (ОС) при весьма серьёзных заболеваниях, например, диабет, рак, нейродегенеративные расстройства, инфертильность и др.

Основным условием понимания и оценки роли ОС в патогенезе является возможность его мониторинга. Последнее весьма существенно как для клинических исследований, так и для выбора терапевтических средств, контроля их качества и оптимизации проводимой терапии.

Проблемы мониторинга упираются в:

- сложность биологической матрицы и быстрое изменение её состава после отбора пробы;
- многообразие соединений различной химической природы, обладающих оксидантными и антиоксидантными свойствами;
- короткий период жизни радикальных соединений;
- отсутствие единого термина и сопоставимых единиц выражения концентрации и антиоксидантных свойств соединений или комплекса соединений, использование для количественной оценки окислительного стресса биоорганических молекул с разнообразными свойствами. Так, в качестве маркеров окислительного стресса при различных заболеваниях предлагается использовать значения концентраций или ферментативной активности отдельных веществ, таких как циклооксигеназа-2, транскрипционный фактор NF-κB, глутатион-S-трансфераза, индуцибельная NO-синтаза, гемоксигеназа-1, белки теплового шока и др. [2, 3].

Показателем степени выраженности ОС может являться антиоксидантная активность (АОА) биологического объекта как интегральный параметр, отражающий антиоксидант/оксидантный статус организма в целом или его отдельной системы, например, репродуктивной системы мужчин [4]. Антиоксидантные свойства предлагают определять, как «antioxidant capacity» and «antioxidant activity», «antioxidant power» [5], «antioxidant ability» [6]. Под первым понимают

«measure of the moles of given free radical scavengers by a test solutions». Под «antioxidant activity» понимают [7] константу скорости действия антиоксиданта против свободных радикалов. Таким образом, наблюдается смешение понятий термодинамических и кинетических. В общем случае термин «активность» используют как термодинамический и его не следует применять как кинетический. Термины «antioxidant power» [5] и «antioxidant ability» [6] не имеют определённой интерпретации. В качестве единиц измерения, как правило, используют относительные единицы, выраженные в граммах аскорбиновой кислоты, тролокса, рутина и т.д. Данные трудно сопоставлять друг с другом, что затрудняет их интерпретацию.

Таким образом, существующая в настоящее время ситуация, связанная с отсутствием единого терминологического подхода и общепринятых единиц измерения, случайным выбором реагентов-окислителей, неоднозначностью и несопоставимостью результатов, ограничивает использование имеющихся многочисленных данных [8-10].

Цель предлагаемого обзора — сформулировать подход к анализу сложных матриц, заключающийся в поиске общих параметров, существенных для исследуемой системы, и разработке методов их определения, предложить показатель ОС и предпочтительный метод его мониторинга в клинических условиях.

Методы определения концентрации свободных радикалов

Методы определения концентрации свободных радикалов можно разделить на прямые и косвенные. Прямые методы — электронный парамагнитный резонанс (ЭПР) и, с некоторыми оговорками, хемилюминесценция (ХЛ). Косвенные методы — определение продуктов реакций, протекавших с участием свободных радикалов, и ингибиторный анализ.

Прямое определение концентрации свободных радикалов в клетках и тканях, в растворах и суспензиях клеточных органелл осложняется их высокой реакционной способностью и малым временем жизни, в результате их концентрация в исследуемых объек-

тах очень низка и отличается от концентрации в живом организме.

Решить часть проблемы, связанную с коротким временем жизни свободных радикалов, позволило использование спиновых ловушек — молекул, которые при взаимодействии с нестабильными радикалами образуют стабильные нитроксильные радикалы (спиновые аддукты), сигналы ЭПР которых затем измеряют с целью качественного и количественного определения концентрации соответствующих радикалов [11].

Аналогичная ситуация сложилась и с применением ХЛ [12]. Реакции рекомбинации супероксид-, гидроксил- и липидных радикалов и оксида азота сопровождаются очень слабой собственной или неактивированной ХЛ. Изучение этой ХЛ внесло большой вклад в исследование процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в биологических мембранах, однако существенным недостатком этого метода является низкая интенсивность сигнала. В связи с этим получили широкое применение так называемые активаторы хемилюминесценции:

– химические, вступающие с определенными радикалами в реакции, сопровождающиеся свечением: люцигенин, дающий свечение с супероксид-радикалами, и люминол, дающий мощное свечение в присутствии гидроксил-радикалов;

– физические (сенсбилизаторы), не вступающие в реакцию с радикалами, но увеличивающие квантовый выход хемилюминесценции за счет переноса энергии электронного возбуждения от молекул-продуктов реакции на активатор: краситель родамин Ж, комплекс европия с тетрациклином или некоторые производные кумарина.

Вторая часть проблемы — изменение состава пробы, извлечённой из организма — остаётся нерешённой.

Косвенные методы определения концентрации свободных радикалов достаточно разнообразны, они в большинстве случаев основаны на свойствах конкретных радикалов. Определяют первичные или вторичные продукты свободнорадикальных реакций, такие как конъюгированные диены или соединения, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой [13].

Вторым широко распространённым методом исследования свободнорадикальных реакций, а точнее — роли свободных радикалов в том или ином процессе в организме, служит использование «перехватчиков» радикалов. Плодотворным оказалось использование фермента супероксиддисмутазы (обычно в сочетании с каталазой), поскольку этот фермент удаляет супероксидные радикалы и только их. Менее очевидны выводы, сделанные на основе опытов с использованием «ловушек» липидных радикалов, таких как токоферол, поскольку перехват радикалов не является единственным результатом действия этих веществ [14].

Концентрацию гидроксидных радикалов определяют, используя спектрофотометрическую, хроматографическую и флуоресцентную регистрацию продуктов реакций окисления и гидроксильирования [15]. Достаточно чувствительный и специфичный метод детекции OH^\bullet радикалов основан на использовании тереф-

талево́й кислоты. При взаимодействии с гидроксидными радикалами терефталевая кислота окисляется до 2-гидрокси-терефталата, который интенсивно флуоресцирует (длина волны возбуждения 326 нм, испускания — 432 нм [16]). В связи с тем, что основным механизмом образования OH^\bullet радикалов в биологических системах является разложение пероксида водорода, катализируемое ионами металлов переменной валентности (реакция Фентона), целесообразной представляется оценка содержания в этих субстратах ионов металлов Fe^{2+} и Cu^+ [16].

Описано определение концентрации супероксид-анион радикалов спектрофотометрическим и электрохимическими методами [17]. Для определения концентрации супероксид-анионов спектрофотометрическим методом используют реакцию восстановления цитохрома *c*, в которой происходит переход от феррицитохрома *c* к ферроцитохрому *c*. Аналитическим сигналом служит изменение оптической плотности среды, измеряемой при $\lambda=550$ нм.

Широкое распространение получили методы определения продуктов свободнорадикального окисления липидов (ПОЛ) [18]. Гидропероксиды являются первичными продуктами ПОЛ, их дальнейший распад часто сопровождается разрывом углерод-углеродной цепи. Они играют центральную роль в окислении липидов. Наиболее распространённые химические методы основаны на восстановлении перекисной группы. Концентрацию гидропероксидов, характеризующую в большой степени процессы свободнорадикального окисления в системе, определяют, титруя гидропероксиды иодид-ионами и фиксируя образующийся иод амперометрически или спектрофотометрически. Известен тиоцианатный метод определения гидроперексидей липидов по изменению оптической плотности при 500 нм в результате образования тиоцианатного комплекса железа(III). Об интенсивности процесса окисления липидов судят по содержанию диеновых конъюгатов (ДК) в плазме крови, что даёт информацию о ранней стадии ПОЛ. ДК экстрагируют из сыворотки крови или ткани гептан-изопропанольной смесью и измеряют оптическую плотность экстракта при 232–234 нм.

О суммарном воздействии оксидантов на организм часто судят по концентрации в сыворотке крови промежуточного продукта ферментативного окисления арахидоновой кислоты и конечного продукта окислительной дегградации липидов — малонового диальдегида [19]. Его концентрация в организме в нормальных условиях поддерживается на определенном уровне благодаря деятельности системы антиоксидантной защиты. Увеличение концентрации малонового диальдегида свидетельствует об усиленном ПОЛ и срыве антиоксидантной защиты. Наиболее распространённым методом определения малонового диальдегида является метод, основанный на реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК), при этом образуется красный пигмент (максимум поглощения при 532–535 нм). Следует принять во внимание, что исследование продуктов окислительного повреждения биомолекул даёт

лишь косвенную информацию или информацию *post factum*, когда необратимый вред уже нанесен.

Методы определения антиоксидантной активности (антиоксидантов)

Существует два основных подхода к оценке оксидант/антиоксидантного статуса организма. Первый связан с прямым определением содержания и/или активности отдельных высокомолекулярных (ферменты системы глутатиона, супероксиддисмутаза, каталаза, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, декарбоксилирующая малатдегидрогеназа, изоцитратдегидрогеназа, редокс-чувствительные факторы транскрипции и др.) и низкомолекулярных (глутатион, мочевиная кислота, аскорбиновая кислота, токоферолы, полифенолы, каротиноиды, ретинол и др) антиоксидантов (АО). Второй подход основан на оценке интегральной антиоксидантной активности (АОА). Принимая во внимание большое количество разнообразных соединений-антиоксидантов, различия механизмов и возможность синергизма их действия в организме, второй подход следует считать предпочтительным и более информативным.

Достаточно полное описание и сравнение основных наиболее популярных интегральных методов ABTS/TEAC, CUPRAC, DPPH, Folin-Ciocalteu и FRAP приведено в обзоре [20]. Авторы исходят из того, что в основе методов определения АО лежат либо процессы переноса электронов (ЕТ), либо перенос атомов водорода (НАТ). Как правило, между этими механизмами трудно или невозможно провести границу. Большинство методов НАТ включает конкурентную схему реакций, в которых антиоксидант и субстрат конкурируют за пероксильные радикалы, термически генерируемые путем разложения азосоединений. В методах ЕТ измеряют способность антиоксидантов восстанавливать окислитель, который сам или специально введенное в систему, реагирующее с ним соединение меняет цвет. Методы ЕТ включают ABTS / TEAC, CUPRAC, DPPH, Folin-Ciocalteu и FRAP, в каждом из которых используются хромогенные окислительно-восстановительные реагенты с различными стандартными окислительно-восстановительными потенциалами.

Приведём несколько примеров. При этом, рассматривая различные методы анализа, мы в основном будем сохранять оригинальную терминологию.

ABTS (ABTS radical scavenging activity). Метод основан на использовании предварительно генерированного радикального катиона 2,2'-азинобис-(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты) - $ABTS^{\bullet+}$, имеющего зелено-голубую окраску и характерный спектр поглощения (максимумы при 660, 734 и 820 нм) [21]. Его получают в результате реакции ABTS с радикалом феррилмиоглобина, который образуется в присутствии метмиоглобина, или окислительно-восстановительных взаимодействий ABTS с пероксидом водорода в присутствии пероксидазы, оксидом марганца (IV) или персульфатом калия. В присутствии АО $ABTS^{\bullet+}$ восстанавливается, что приводит к ослаблению окраски. Достоинства метода: аналитическим

сигналом служит легко измеряемое уменьшение оптической плотности, катион-радикал образуется предварительно перед добавлением анализируемой пробы в систему. Метод применим для определения как липофильных, так и гидрофильных антиоксидантов, включая флавоноиды и антиоксиданты плазмы крови.

В качестве стандарта используют тролокс (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота). Количественно концентрацию АО выражают в единицах Trolox эквивалента (ТЕ), в ммоль/г, ммоль/мл, Мм [22] или в эффективной концентрации образца EC_{50} (мг/мл), вызывающей 50% снижение исходной оптической плотности при длинах волн 734 или 645 нм. Фирмой Randox Laboratories Ltd (Великобритания) на основе метода ABTS разработан коммерциализованный вариант — TEAC анализ (Trolox equivalent capacity assay) и выпускается набор реактивов Total Antioxidant Status (TAS) для определения общей антиоксидантной ёмкости (активности) сыворотки и плазмы крови, вин, пива и фруктовых соков. Большим преимуществом метода является его стандартизованность и возможность сравнения данных, полученных исследователями в разных лабораториях. К сожалению, анализ является одним из самых дорогих и имеет невысокую репрезентативность применения в исследовании процессов в живых системах.

DPPH. Анализ основан [23] на спектрофотометрическом определении изменения концентрации стабильного 2, 2-дифенил-1-пикрилгидразил радикала ($DPPH^{\bullet}$). Последний восстанавливается в растворе метанола или этанола донорами электронов (АО), образуется бесцветный DPPH-H. Изменение оптической плотности раствора при длине волны 517 нм даёт информацию о концентрации АО.

Активность выражают в виде эффективной концентрации анализируемого образца, при которой происходит 50% восстановление радикалов $DPPH^{\bullet}$, в мг/мл. В качестве эталонного соединения используют антиоксиданты α -токоферол или кверцетин.

Метод широко используется для определения антиоксидантной активности природных веществ. Гидрофобность радикала $DPPH^{\bullet}$ ограничивает область применения метода возможностью определения только жирорастворимых антиоксидантов.

ABAP. В качестве сигналообразующего процесса в методе используют замедление окисления каротиноида кроцина пероксильными и алкоксильными радикалами, в котором кроцин обесцвечивается [24]. Радикалы генерируются при термическом разложении 2',2'-азобис-(2-амидинопропан) дигидрохлорида (ABAP) на два свободных радикала. При введении анализируемого образца процесс обесцвечивания замедляется в результате восстановления образующихся радикалов антиоксидантами пробы. Аналитическим сигналом является оптическая плотность раствора при длине волны 450 нм. Метод стандартизован по Тролоксу.

FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power assay). Метод FRAP основан на восстановлении антиоксидантами ионов Fe^{3+} до Fe^{2+} . Предложено несколько соеди-

нений, имеющих в своей структуре ион железа. Наиболее часто используют комплекс трипиридилтриазина Fe(III)(TPTZ)₃, восстановление которого сопровождается образованием окрашенного в интенсивно синий цвет (максимум поглощения при длине волны 593 нм) комплекса Fe(II)(TPTZ)₂ [25]. Достаточно широко используют реакцию восстановления антиоксидантами K₃[Fe³⁺(CN)₆], сопровождающуюся образованием окрашенного в желтый цвет K₄[Fe²⁺(CN)₆] (максимум поглощения при 700 нм). АОА оценивают спектрофотометрически по оптической плотности раствора, пользуясь градуировочной кривой.

Недостатком метода является необходимость использования кислой среды, что не позволяет оценить вклад в интегральную АОА антиоксидантов, содержащих SH-группы (глутатион, альбумин, некоторые аминокислоты).

CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity assay) основан на способности АО взаимодействовать с комплексом Cu(II) — неocupроин. При этом Cu(II) восстанавливается до Cu(I) и образует с неocupроином окрашенный комплекс (максимум поглощения в области 450 нм) [26]. Метод CUPRAC имеет ряд преимуществ по сравнению с другими фотометрическими методами определения антиоксидантов:

- возможность анализа при физиологическом значении pH;
- применим для определения гидрофильных и липофильных антиоксидантов;
- реагирует на более широкий круг тиолсодержащих антиоксидантов, чем метод FRAP;
- более селективен, чем FRAP анализ, так как благодаря более низкому значению окислительно-восстановительного потенциала реагента не окисляет сахара и лимонную кислоту, обычно содержащиеся в пищевых продуктах;
- калибровочная кривая линейна в широком диапазоне концентраций.

Авторы [27] при определении АОА методом CUPRAC использовали электрохимические методы детектирования концентрации комплексов меди [Cu(Nc)₂]²⁺ и [Cu(Nc)₂]⁺. Удобными методами детекции являются вольтамперометрия и хроноамперометрия.

ORAC (the oxygen radical absorbance capacity). Метод широко используется для интегральной оценки антиоксидантного состояния биологических жидкостей [28].

Измеряют уменьшение концентрации и, соответственно, снижение флуоресценции, флуоресцирующего вещества (бета-фикоэритрина, или флуоресцеина) после смешивания с генераторами свободных радикалов. Антиоксиданты замедляют этот процесс (защищают флуоресцирующую молекулу). Оборудование, которое может автоматически измерять и вычислять антиоксидантную емкость, доступно в продаже (Biotek, Roche Diagnostics).

В качестве стандартных соединений применяют тролокс (определение пероксидов) и галловую кислоту (определение гидроксил-радикалов). Единицей измерения АОА является микромоляр стандарта на единицу

массы или объема. Результаты укладываются в диапазон +/- 5%.

Принципиально в методе ORAC в качестве действующего окислителя могут выступать супероксид-анион O₂^{•-} и соединения нерадикальной природы — синглетный кислород (¹O₂) и пероксинитрит (ONOO⁻). Поскольку супероксидный радикал является предшественником многих других АФК, его использование в этом методе позволяет достаточно адекватно определять АОА биологических жидкостей и фармацевтических субстанций. Супероксид-анион может быть получен в реакции фотоокисления рибофлавина.

Метод ORAC относительно прост, не требует практически никакой предварительной пробоподготовки, чувствителен, может быть использован для определения АОА как водорастворимых, так и жирорастворимых объектов, таких как пищевые продукты, напитки, плазма и сыворотка крови, моча [28]. Недостатки метода: длительность, узкий динамический диапазон, что связано с высокой реакционной способностью RO₂[•] и, особенно, HO[•], который способен взаимодействовать практически со всеми органическими соединениями, в результате как АО регистрируются вещества, таковыми не являющиеся (редуцирующие сахара, гуминовые кислоты).

TBARS анализ (thiobarbituric acid reactive substance assay). В этом методе в качестве источника информации об АОА биологического объекта используют концентрацию продукта перекисного окисления липидов (ПОЛ) — малонового диальдегида (МДА), который считают маркером ОС. МДА вступает в реакцию с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК), образуя хромогенный триметиловый комплекс розового цвета, концентрацию которого определяют спектрофотометрически по оптической плотности при длине волны 532 нм. Концентрацию выражают в мкмоль/л.

Метод удобен, чувствителен и не требует дорогостоящего оборудования.

Недостаток метода обусловлен не очень удачным выбором сигналообразующего вещества. МДА не является веществом, образующимся исключительно в результате ПОЛ, и единственным конечным продуктом этого процесса. Кроме того, реакция ТБК с МДА не абсолютно селективна. В неё вступают, например, альдегиды, аминокислоты, соединения, содержащие SH-, NH₂-группы. Таким образом, при использовании метода можно говорить об изменении концентрации не МДА, а веществ, реагирующих с ТБК.

Хемоллюминесцентный метод определения АО не является самостоятельным: он используется как метод регистрации сигнала, связанного с концентрацией АО. Последний формируется, например, в хемиллюминесцентной реакции между люминолом и АВАР или в присутствии других пар реагентов. При этом интенсивность хемиллюминесценции является мерой концентрации радикалов. При введении в систему АО последняя уменьшается, а вместе с этим падает и интенсивность хемиллюминесценции.

Хроматографические методы используют в основном для определения индивидуальных АО. Применя-

ют все методы хроматографии: тонкослойную (ТСХ), высокоэффективную ТСХ, газовую, жидкостную, высокоэффективную жидкостную (ВЭЖХ) [29]. Методы детектирования — пламенно-ионизационный, по изменению теплопроводности, UV-VIS спектроскопия, флуоресценция, масс-спектрометрия, электрохимические [30].

Электрохимические методы определения АОА. Возрастающий интерес к электрохимическим методам определения отдельных АО и интегральной величины АОА обусловлен тем, что электрохимические методы позволяют напрямую оценить электронно-донорно-акцепторные свойства исследуемого образца, т.е. максимально полно отвечают природе ОС. Кроме того, эти методы отличает чувствительность, простота аналитической процедуры, экспрессность, низкая стоимость аппаратуры и реактивов, простота автоматизации измерений.

Авторами [31] подробно описаны электрохимические методы определения интегральной антиоксидантной активности («ёмкости» — термин, принятый авторами). Используются разные направления электроаналитической химии: кулонометрия, вольтамперометрия в различных вариантах (циклическая, дифференциально-импульсная, квадратно-волновая), амперометрия, хроноамперометрия, потенциометрия. В основе электрохимических методов лежат окислительно-восстановительные реакции, происходящие на поверхности электрода (вольтамперометрия, амперометрия) или в объёме раствора (хроноамперометрия, потенциометрия, кулонометрия), результат которых регистрируется электрохимически. Процессы, включающие химические и электрохимические реакции, могут рассматриваться как гибридные варианты. Используют, как правило, медиаторные системы $\text{DPPH}^{\bullet}/\text{DPPH}$, $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, $\text{I}_2/2\text{I}^-$, $\text{Br}_2/2\text{Br}^-$ или реагент, специально введённый в исследуемый раствор [32].

В большинстве работ описано определение АО в пищевых продуктах, растениях и экстрактах из них. Лишь единичные из опубликованных работ содержат информацию о применении электрохимических методов для определения концентрации АО собственно в биологических объектах: плазме крови [33], эякуляте [34, 35] и коже [36, 37]. В основном для этих целей предлагается использовать развивающийся в настоящее время потенциометрический метод [8, 38]. Далее мы посвятим максимальное внимание использованию электрохимических методов для оценки антиоксидантной активности биологических объектов как критерия оценки оксидантного стресса. Остановимся подробнее на каждом из электрохимических методов определения АОА.

Вольтамперометрия. При использовании различных вариантов вольтамперометрии измеряемым сигналом, дающим информацию о концентрации АО, является предельный диффузионный ток или пик тока, наблюдающиеся в определённой области потенциалов. При этом в процессе участвуют отдельные АО [39] или их сумма [40].

Гибридный вариант, включающий взаимодействие АО с кислородом, и электрохимическое восстановление непрореагировавшего кислорода, описан в работах [41]. В качестве критерия АОА исследуемых веществ используют кинетический критерий K , с размерность которого $\text{мкмоль/л}\cdot\text{мин.}$, отражающий количество кислорода и активных кислородных радикалов, прореагировавших с АО (или смесью АО) за минуту.

Метод вольтамперометрии отличается хорошей чувствительностью, является достаточно простым и дешёвым. Однако, разброс показаний при идентичных измерениях оказался достаточно высоким (до 1,5–2,0 раз).

Амперометрия и хроноамперометрия (биамперометрия) являются одним и тем же методом, источником информации о содержании АО или АОА в котором является ток, регистрируемый при заданном потенциале электрода.

Авторами [32] разработан гибридный вариант хроноамперометрического метода определения АОА биологических жидкостей. В качестве источника информации используют ток электроокисления ферроцианида калия, образующегося при взаимодействии определяемых АО с предварительно введённым в раствор феррицианидом калия.

К преимуществам амперометрических методов относятся: низкий предел обнаружения, высокая селективность (определяются только соединения, молекулы которых могут окисляться в выбранных условиях, другие соединения, присутствующие даже в больших концентрациях, не мешают определению), малый объём пробы, простота обслуживания. В то же время использование этого метода для определения общей АОА может быть сопряжено с существенными ошибками измерения [42], связанными со сложностью выбора потенциала электрода.

Кулонометрия. Определение АОА кулонометрическим методом включает титрование АО электрогенерированными титрантами — галогенами Cl_2 , Br_2 , возникающими в процессе электролиза растворов KCl и KBr [43]. Конечную точку титрования фиксируют амперометрически с двумя поляризованными платиновыми электродами. АОА, называемую в работе [43] ёмкостью, рассчитывают, как количество электричества, затраченное на титрование, в пересчёте на 100 г сухого вещества (или 100 мл).

Потенциометрический метод широко используется для определения АОА различных веществ, а в последнее время ОА биологических объектов. Остановимся на этом методе подробнее.

Индикаторным сигналом при определении АОА/ОА служит окислительно-восстановительный потенциал (ОВП) который, казалось бы, легко измерить. Однако при этом потенциал является не равновесным, а стационарным, зависящим от большого количества неучитываемых факторов. Сложные объекты, например, биологические жидкости, содержат большое количество редокс-систем, не все из которых достаточно обратимы, вклад в величину окислительно-восстановительного потенциала обра-

тимых и необратимых систем несоизмерим. Это делает неэффективным прямые измерения окислительно-восстановительного потенциала. Тем не менее, авторы некоторых работ используют именно эту величину в качестве источника информации о фертильности мужчин путём исследования эякулята [35, 38, 44].

В серии более ранних работ [33, 34, 36, 37, 45] указанную принципиальную сложность предложено преодолевать путём введения анализируемой пробы в медиаторную систему, содержащую реагенты, включающие элемент в окисленной и восстановленной форме, которые вступают в химическую реакцию с антиоксидантами или оксидантами.

Применение медиаторной системы обеспечивает возможность измерения равновесного потенциала вместо стационарного.

Условия корректного определения АОА/ОА биологических объектов сформулированы в работе [8, 46]

– электрохимическая реакция окислителя/восстановителя с большинством АО/Ох должна быть термодинамически возможной;

– окислительно-восстановительный потенциал (ОВП) медиаторной системы в условиях анализа должен находиться между потенциалами Ох и АО и между ними должна существовать определённая разность;

– реакция компонентов медиаторной системы с АО/Ох должна реализовываться в условиях, близких к физиологическим, т.е. при рН, близком к 7;

– реакция компонентов медиаторной системы с АО/Ох должна протекать стехиометрично в соответствии с количеством функциональных групп, проявляющих антиоксидантные/оксидантные свойства;

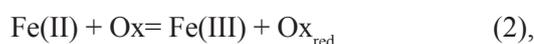
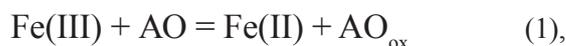
– должна быть реализуемой возможность получать

результат в универсальных единицах измерения, например, М-эquiv;

– скорость окислительно-восстановительной реакции должна быть достаточной, чтобы процесс реализовывался в разумное время.

К сожалению, эти соображения не учитываются многими исследователями при выборе окислителя для оценки интегральной величины АОА.

Приведённым условиям соответствует предложенная авторами [45] медиаторная система $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$. Источником информации об АОА/ОА служит сдвиг потенциала Pt электрода, наблюдающийся при введении пробы в раствор, содержащий медиаторную систему. Этот сдвиг является следствием изменения соотношения окисленной и восстановленной форм компонентов медиаторной системы в результате протекания реакций (1) при определении АОА и (2) — ОА:



где: АО и AO_{ox} — антиоксидант и его окисленная форма; Ох и $O_{x_{red}}$ — оксидант и его восстановленная форма.

ОВП активных форм кислорода и азота (АФК и АФА) и некоторых АО представлены в таблицах 1 – 3, соответственно. Стандартный ОВП $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ равен +0,36 В [8]. Сопоставляя приведённые данные, легко заключить, что сигналообразующая реакция может протекать как с Ох, так и АО.

Таблица 1
Окислительно-восстановительные потенциалы АФК
Table 1
Oxidation-reduction potentials of the ROS

АФК/ROS	Стандартный потенциал системы, В отн. НВЭ [47] Standard potential of the system V, rel. to NHE [47]		Уравнение полуреакции/ Half reaction equation	Потенциал системы при рН=7*, В отн. НВЭ [8]/ Potential of the system at рН=7*, V rel. to NHE [8]
	При рН=0 и активности соединений, равных 1/ At рН=0 and compound's activity equal to 1	При рН=14 и активности соединений, равных 1/ At рН=14 and compound's activity equal to 1		
H_2O_2/OH^*	+1,14		$H_2O_2 + H^+ + e = OH^* + H_2O$	+0,72
HO_2^*/H_2O_2	+1,44		$HO_2^* + H^+ + e = H_2O_2$	+1,02
H_2O_2/H_2O	+1,763		$H_2O_2 + 2H^+ + 2e = H_2O$	+1,343
OH^*/H_2O	+2,38		$OH^* + H^+ + e = H_2O$	+1,96
HO_2^*/H_2O	+1,65		$HO_2^* + 3H^+ + 3e = 2H_2O$	+1,23
O_2^{*-}/OH^-		+0,645	$O_2^{*-} + 2H_2O + 3e = 4OH^-$	+1,205
O_2^{*-}/HO_2^-		+0,20	$O_2^{*-} + H_2O + e = HO_2^- + OH^-$	+0,62
HO_2^-/OH^*		+0,184	$HO_2^- + H_2O + e = OH^* + 2OH^-$	+1,024
OH^*/OH^-		+1,985	$OH^* + e = OH^-$	+2,405

*Окислительно-восстановительный потенциал пересчитан для рН=7 с учетом числа электронов и ионов водорода или гидроксидов, участвующих в окислительно-восстановительном равновесии [8].

* Redox potential is recalculated for рН=7 taking into consideration a number of electrons and hydrogen or hydroxyl ions taking part in redox balance [8].

Таблица 2
Окислительно-восстановительные потенциалы АФА [48]
Table 2
Oxidation-reduction potentials ROS [48]

Вид/Type	ОВП при pH=7.0, В/ Redox potential at pH=7.0, V
NO*	+0,39
ONOO ⁻ / ONOOH	+0,80
NO2*	+0,99
CO3 ²⁻	+1,80
HO*	+2,30

Таблица 3
Окислительно-восстановительные потенциалы (В отн. НВЭ) некоторых АО при pH=7 и соотношении активностей соединений, равных 1 [8]

Table 3
Redox potentials (V, rel. to NHE) of some AO at pH=7 and compound's activity ratio equal to 1 [8]

АО	ОВП/ Redox potential	АО	ОВП/ Redox potential
Цистеин/ Cysteine	-0,26	Аскорбиновая кислота/ Ascorbic acid	-0,23
Глутатион/ Glutathione	-0,22	Пирогаллол/ Pyrogallol	-0,23
Мочевая кислота/ Uric acid	-0,03	Кофейная кислота/ Caffeic acid	-0,14
Катехол/ Catechol	-0,12	Рутин/ Rutin	-0,06

Равновесие между компонентами медиаторной системы описывается известным уравнением:

$$E_1 = E_0 + b \times \lg \frac{f_{ox} \cdot C_{Ox}}{f_{red} \cdot C_{Red}} \quad (3),$$

где:

E — потенциал медиаторной системы в исходном состоянии, В;

E_0 — стандартный потенциал медиаторной системы, В;

f — коэффициенты активности (при расчёте ΔE исчезают из вычислений, поскольку концентрация электролита не изменяется)

C_{Ox} — концентрация окисленной формы медиаторной системы, М;

C_{Red} — концентрация восстановленной формы медиаторной системы, М;

$b = 2,3RT/nF$ — предлогарифмический коэффициент уравнения Нернста;

R — универсальная газовая постоянная;

T — температура, °К;

n — число электронов, участвующих в окислительно-восстановительной реакции;

F — число Фарадея.

Введение в медиаторную систему антиоксиданта или оксиданта приводит к смещению равновесия между её компонентами и, соответственно, к сдвигу потенциала.

После введения в раствор образца, содержащего антиоксиданты, потенциал медиаторной системы может быть выражен уравнением:

$$E_1 = E_0 + b \cdot \lg \frac{f_{ox}(C_{Ox} - X)}{f_{red}(C_{Red} + X)} \quad (4),$$

где

E_1 — измеряемый потенциал системы после введения анализируемого образца, В;

X — концентрация антиоксидантов в растворе после введения в него анализируемого образца, М-экв.

После введения в раствор образца, содержащего оксиданты, потенциал медиаторной системы может быть выражен уравнением:

$$E_1 = E_0 + b \cdot \lg \frac{f_{ox}(C_{Ox} + X)}{f_{red}(C_{Red} - X)} \quad (5),$$

где

E_1 — измеряемый потенциал в системе после введения анализируемого образца, в;

X — концентрация оксидантов в растворе после введения в него анализируемого образца, М-экв.

Воспользовавшись величиной $\Delta E = E_1 - E_0$, легко расчитать

$$X = AOA = \frac{C_{Ox} - \alpha C_{Red}}{1 + \alpha} \quad (6),$$

$$X = OA = \frac{\alpha C_{Red} - C_{Ox}}{1 + \alpha} \quad (7).$$

Или

$$AOA/OA = \pm \frac{C_{Ox} - \alpha C_{Red}}{1 + \alpha}, \quad \alpha = \left(\frac{C_{Ox}}{C_{Red}} \right) \cdot 10^{\Delta E n F / 2,3RT} \quad (8)$$

Потенциометрический метод с медиаторной системой успешно применялся для определения АОА пищевых продуктов [45, 49], биологических жидкостей (кровь и её фракции, семенная и фолликулярная жидкости) [4, 33, 34]. Результаты хорошо коррелируют с данными, полученными с помощью известных методов Randox и фотометрического метода с использованием стабильного радикала DPPH*.

Описан неинвазивный вариант потенциометрического метода определения АОА кожи. Источником информации является сдвиг потенциала платинового электрода, наблюдаемый, когда исследуемая часть кожи вводится в контакт со средой, содержащей медиаторную систему. Электродом сравнения служит электрод для ЭКГ. Для доказательства достоверности данных, полученных предложенным методом, исследованы модельные системы, содержащие ряд антиоксидантов в разных концентрациях [36], показана взаимосвязь между величиной АОА кожи и наличием сердечно-сосудистых патологий [37].

Потенциометрический метод прямой и позволяет определять как АОА, так и ОА, результат измерения

выражается в понятных и однозначных единицах концентрации — моль-экв/л и моль-экв/г в случае анализа жидкого или твёрдого объекта. При его реализации не требуется применение стандартных растворов, метода добавок и/или предварительного построения калибровочных кривых.

Заключение

В работе рассмотрен общий подход к анализу сложных матриц, заключающийся в использовании общих параметров, существенных для исследуемой системы, и интегральных методов их определения. Предметом анализа являются биологические системы, а определяемыми веществами — антиоксиданты и оксиданты.

Приведённый анализ методов мониторинга ОС даёт основания считать, что в качестве показателя ОС предпочтительно использовать интегральную АОА/ОА биологических объектов, а приоритетным методом её определения — потенциометрию с медиаторной системой.

Этот вывод основан на следующих соображениях:

– электрохимические методы позволяют напрямую оценить электронно-донорно-акцепторные свойства исследуемого образца, т.е. максимально полно отвечают природе ОС и действию системы антиоксидантной защиты организма;

– эти методы отличает аппаратурная и операторская простота, финансовая, временная и информативная эффективность;

– в настоящее время они легко могут быть применены в условиях клинической лаборатории и на их основе могут быть созданы сенсорные системы для работы в форматах on-site и in-situ.

Мониторинг оксидант/антиоксидантного состояния среды является инструментом развития ряда областей науки и техники и играет важную роль в обнаружении серьёзных заболеваний на ранних стадиях, выборе терапии и оценке её эффективности.

ЛИТЕРАТУРА

1. 18th ISANH Middle East Antioxidants World Congress, Beirut Antioxidants 2017. Available at: <https://www.isanh-me.com/>.
2. Montezano A.C., Dulak-Lis M., Tsiropoulou S., Harvey A., Briones A.M., Touyz R.M. Oxidative Stress and Human Hypertension: Vascular Mechanisms, Biomarkers, and Novel Therapies. *Canadian Journal of Cardiology*. 2015; 31: 631-641.
3. Siti H.N., Kamisaha Y., Kamsiah J. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). *Vascular Pharmacology* 2015; 71: 40–56.
4. Брайнина Х.З., Герасимова Е.Л., Казаков Я.Е., Ходос М.Я. Окислительный стресс: природа, вклад в патогенез, защита и диагностика. В кн.: Будников Г.К., ред. Проблемы аналитической химии, Том 11, Химический анализ в медицинской диагностике. М.: Наука; 2010: 132-63.
5. Müller L., Fröhlich K., Böhm V. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (α TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. *Food Chemistry*. 2011; 129 (1): 139-48.
6. Cortina-Puig M., Prieto-Simón B., Campàs M., Calas-Blanchard C., Marty J.-L. Determination of the antioxidants' ability to scavenge free radicals using biosensors. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2010; 698: 222-33.
7. Gizelli A., Serafini M., Natella F., Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radical Biology & Medicine*. 2000; 29: 1106-14.
8. Ivanova A.V., Gerasimova E.L., Brainina Kh.Z. Potentiometric study of antioxidant activity: development and prospects. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 2015; 45 (4): 311-22.
9. Cao G., Prior R. L. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of

REFERENCES

1. 18th ISANH Middle East Antioxidants World Congress, Beirut Antioxidants 2017. Available at: <https://www.isanh-me.com/>.
2. Montezano A.C., Dulak-Lis M., Tsiropoulou S., Harvey A., Briones A.M., Touyz R.M. Oxidative Stress and Human Hypertension: Vascular Mechanisms, Biomarkers, and Novel Therapies. *Canadian Journal of Cardiology*. 2015; 31: 631-641.
3. Siti H.N., Kamisaha Y., Kamsiah J. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). *Vascular Pharmacology* 2015; 71: 40-56.
4. Brainina Kh.Z., Gerasimova E.L., Kazakov Ja. E.; et al. Oxidative stress: nature, contribution to pathogenesis, protection and diagnosis. In: Budnikov G.K., ed. *Problems of Analytical Chemistry, Vol. 11, Chemical Analysis in Medical Diagnosis* [Okislitel'nyj stress: priroda, vklad v patogenez, zashhita i diagnostika. V kn. Budnikov G.K., red. Problemy analiticheskoy himii, Vol. 11, Hemichekij analiz v medicinskoj diagnostike]. M: Science [Nauka Publishers]. 2010, pp. 132-63, [In Russ.].
5. Müller L., Fröhlich K., Böhm V. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (α TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. *Food Chemistry*. 2011. Vol. 129 (1), pp.139-48.
6. Cortina-Puig M., Prieto-Simón B., Campàs M.; et al. Determination of the antioxidants' ability to scavenge free radicals using biosensors. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2010. Vol. 698, pp.222-33.
7. Gizelli A., Serafini M., Natella F.; et al. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radical Biology & Medicine*. 2000. Vol. 29, pp. 1106-14.
8. Ivanova A.V., Gerasimova E.L., Brainina Kh.Z. Potentiometric study of antioxidant activity: development and prospects. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 2015. Vol. 45 (4), pp. 311-22.

- human serum. *Clinical Chemistry*. 1998; 44:1309–15.
10. Badarinath A.V., Rao K. M., Chetty C. M. S., Ramkanth S., Rajan T.V.S, Gnanaprakash K. A Review on In-vitro Antioxidant Methods: Comparisons, Correlations and Considerations. *Inter. J. PharmTech Res*. 2010; 2 (2): 1276-85.
 11. Valgimigli L., Pedulli G.F., Paolini M., Mesasurement of oxidative stress by EPR radical-probe technique. *Free Radical Biology and Medicine*. 2001; 31: 708–16.
 12. Владимиров Ю.А., Проскурина Е. В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция. *Успехи биологической химии*. 2009; 49: 341-88.
 13. Владимиров Ю.А., Азизова О.А., Деев А.И., Козлов А.В., Осипов А.Н., Рощупкин Д.И. Свободные радикалы в живых системах. *Итоги Науки и Техники, сер. Биофизика*, т. 29. М: ВИНТИ; 1992.
 14. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы и антиоксиданты. *Вестник РАМН*. 1998; 7: 43-51.
 15. Peralta E., Roa G., Hernandez-Servin J.A., Romero R., Balderas P., Natividad R. Hydroxyl Radicals quantification by UV spectrophotometry. *Electrochimica Acta*. 2014; 129: 137–41.
 16. Cao G., Alessio H.M., Cutler R.G. Oxygen radical absorbing capacity assay for antioxidants. *Free Radic. Biol. Med*. 1993; 14 (1): 303-11.
 17. Tarpey M.M., Fridovich I., Review Methods of detection of vascular reactive species nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxyxynitrite. *Circulation Research*. 2001; 89: 224-36.
 18. Донцов В.И., Крутько В.Н., Мрикаев Б.М., Уханов С.В. Активные формы кислорода как система: значение в физиологии, патологии и естественном старении. *Тр. ИСА РАН*. 2006; 19: 50-69.
 19. Karatas F., Karatepe M., Baysar A. Determination of free malondialdehyde in human serum by high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*. 2002; 311 (1): 76-9.
 20. Apak R., Güçlü K., Demirata B., Özyürek M., Celik S.E., Bektasoğlu B. et al. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*. 2007; 12: 1496-547.
 21. Rice-Evans C.A., Miller N. J. Total Antioxidant Status in Plasma and Body Fluids. *Meth. Enzymol*. 1994; 234: 279–93.
 22. Wang C.C., Chu C.Y., Chu K.O., Choy K.W., Khaw K.S., Rogers M.S. et al. Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity Assay Versus Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay in Plasma. *Clin. Chem*. 2004; 50 (5): 952- 4.
 23. Pyrzynska K., Pękal A. Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples (Review). *Anal. Methods*. 2013; 5 (17): 4288-95.
 24. Nile S.H., Khobragade C.N., Park S.W. Optimized and comparative antioxidant assays and its applications in herbal and synthetic drug analysis as antioxidants. *Mini Rev Med Chem*. 2012; 12 (10): 1007-14.
 25. Benzie I.F., Strain J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal Biochem*. 1996; 239 (1): 70-6.
 26. Apak R. Mechanism of antioxidant capacity assays and
 9. Cao G., Prior R. L. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clinical Chemistry*. 1998. Vol. 44, pp. 1309–15.
 10. Badarinath A.V., Rao K. M., Chetty C. M. S.; et al. Review on In-vitro Antioxidant Methods: Comparisons, Correlations and Considerations. *Inter. J. PharmTech Res*. 2010. Vol. 2 (2), pp. 1276-85.
 11. Valgimigli L., Pedulli G.F., Paolini M., Mesasurement of oxidative stress by EPR radical-probe technique. *Free Radical Biology and Medicine*. 2001. Vol. 31, pp. 708–16.
 12. Vladimirov Yu.A., Proskurina E.V. Free radicals and cellular chemiluminescence [Svobodnye radikaly i kletochnaja hemiljuminescencija]. *Biological Chhemistry Reviews [Uspekhi Biologicheskoi Khimii]*. 2009. Vol. 49, pp. 341-88, [In Russ.].
 13. Vladimirov Yu.A., Azizova O.A., Deev A.I.; et al. Free radicals in living systems [Svobodnye radikaly v zhivyyh sistemah]. *Results of Science and Technology, ser. Biophysics [Itogi Nauki i Tehniki, ser. Biofizika]*, vol. 29. М: VINITI. 1992, [In Russ.].
 14. Vladimirov Yu.A. Free radicals and antioxidants [Svobodnye radikaly i antioksidanty]. *Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences [Vestnik RAMN]*. 1998. Vol. 7, pp. 43-51, [In Russ.].
 15. Peralta E., Roa G., Hernandez-Servin J.A., Romero R.; et al. Hydroxyl Radicals quantification by UV spectrophotometry. *Electrochimica Acta*. 2014. Vol. 129, pp. 137–41.
 16. Cao G., Alessio H.M., Cutler R.G. Oxygen radical absorbing capacity assay for antioxidants. *Free Radic. Biol. Med*. 1993. Vol. 14 (1), pp. 303-11.
 17. Tarpey M.M., Fridovich I. Review Methods of detection of vascular reactive species nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxyxynitrite. *Circulation Research*. 2001. Vol. 89, pp. 224-36.
 18. Donzov V.I., Krut'ko V.N., Mrikaev B.M.; et al. Active forms of oxygen as a system: value in physiology, pathology and natural aging [Aktivnyye formy kisloroda kak sistema: znachenie v fiziologii, patologii i estestvennom starenii]. *Proc. ISA RAS [Tr. ISA RAN]*. 2006, no 19, pp. 50-69, [In Russ.].
 19. Karatas F., Karatepe M., Baysar A. Determination of free malondialdehyde in human serum by high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*. 2002. Vol. 311 (1), pp. 76-9.
 20. Apak R., Güçlü K., Demirata B.; et al. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*. 2007. Vol. 12, 1496-547.
 21. Rice-Evans C.A., Miller N. J. Total Antioxidant Status in Plasma and Body Fluids. *Meth. Enzymol*. 1994. Vol. 234, pp. 279–93.
 22. Wang C.C., Chu C.Y., Chu K.O.; et al. Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity Assay Versus Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay in Plasma. *Clin. Chem*. 2004. Vol. 50 (5), pp. 952- 4.
 23. Pyrzynska K., Pękal A. Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples (Review). *Anal. Methods*. 2013.

- the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. *Microchimica Acta*. 2008; 160 (4): 413-19.
27. Cárdenasa A., Gómezb M., Frontana C. Development of an Electrochemical Cupric Reducing Antioxidant Capacity Method (CUPRAC) for Antioxidant. *Electrochimica Acta*. 2014; 128 (10): 113–8.
28. Huang D., Ou B., Hampsch-Woodill M., Flanagan J.A., Prior R. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50 (16): 4437-44.
29. Jesionek W., Majer-Dziedzic B., Choma I. M. Separation, identification, and investigation of antioxidant ability of plant extract components using TLC, LC–MS, and TLC–DPPH. *J. Liquid Chromatography and Related Technologies*. 2015; 38: 1147–53.
30. Pisoschi A.M., Pop A., Cimpeanu C., Predoi G. Antioxidant capacity determination in plants and plant-derived products: A Review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016; 2016: 36 p. Article ID 9130976. Available at: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2016/9130976/>.
31. Pisoschi A.M., Cimpeanu C., Predoi G. Electrochemical Methods for Total Antioxidant Capacity and its Main Contributors Determination: A review. *Open Chem*. 2015; 13 (1): 824-56.
32. Брайнина Х.З., Варзакова Д.П., Герасимова Е.Л. Хроноамперометрический метод определения интегральной антиоксидантной активности. *Журн. Аналит. Химии*. 2012; 67 (4): 409–15.
33. Brainina Kh.Z., Alyoshina L.V., Gerasimova E.L., Kazakov Ya.E., Ivanova A.V., Beykin Ya.B. et al. New Electrochemical Method of Determining Blood and Blood Fractions Antioxidant Activity. *Electroanalysis*. 2009; 21 (3-5): 618-24.
34. Brainina K.Z., Gerasimova E.L., Varzakova D.P., Balezin S.L., Portnov I.G. et al. Potentiometric method for evaluating the Oxidant/Antioxidant activity of seminal and follicular fluids and clinical significance of this parameter for human reproductive function. *Open Chemical and Biomedical Methods Journal*. 2012; 5: 1-7.
35. Agarwal A., Roychoudhury S., Sharma R., Gupta S., Majzoub A., Sabanegh E. Diagnostic application of oxidation-reduction potential assay for measurement of oxidative stress: Clinical utility in male factor infertility. *Reproductive BioMedicine Online*. 2016; 34(1): 48-57.
36. Brainina Kh., Galperin L., Gerasimova E., Khodos M. Noninvasive Potentiometric Method of Determination of Skin Oxidant/Antioxidant Activity. *IEEE Sensors Journal*. 2012; 12 (3): 527-32.
37. Brainina Kh.Z., Gerasimova E.L., Varzakova D.P., Kazakov Ya.E., Galperin L.G. Noninvasive method of determining skin antioxidant/oxidant activity: clinical and cosmetics applications. *Anal. Bioanal. Electrochem*. 2013; 5 (5): 528-42.
38. Agarwal A., Sharma R., Roychoudhury S., Du Plessis S., Sabanegh E. MiOXSYS: a novel method of measuring oxidation reduction potential in semen and seminal plasma. *Fertil Steril*. 2016; 106 (3): 566-73.
- Vol. 5 (17), pp. 4288-95.
24. Nile S.H., Khobragade C.N., Park S.W. Optimized and comparative antioxidant assays and its applications in herbal and synthetic drug analysis as antioxidants. *Mini Rev Med Chem*. 2012. Vol. 12 (10), pp. 1007-14.
25. Benzie I.F., Strain J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal Biochem*. 1996. Vol. 239 (1), pp. 70-6.
26. Apak R. Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. *Microchimica Acta*. 2008. Vol. 160 (4), pp. 413-19.
27. Cárdenasa A., Gómezb M., Frontana C. Development of an Electrochemical Cupric Reducing Antioxidant Capacity Method (CUPRAC) for Antioxidant. *Electrochimica Acta*. 2014. Vol. 128 (10), pp. 113–8.
28. Huang D., Ou B., Hampsch-Woodill M.; et al. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J. Agric. Food Chem*. 2002. Vol. 50 (16), pp. 4437-44.
29. Jesionek W., Majer-Dziedzic B., Choma I. M. Separation, identification, and investigation of antioxidant ability of plant extract components using TLC, LC–MS, and TLC–DPPH. *J. Liquid Chromatography and Related Technologies*. 2015. Vol. 38, pp. 1147–53.
30. Pisoschi A.M., Pop A., Cimpeanu C.; et al. Antioxidant capacity determination in plants and plant-derived products: A Review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016. Vol. 2016, 36 p. Article ID 9130976. Available at: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2016/9130976/>.
31. Pisoschi A.M., Cimpeanu C., Predoi G. Electrochemical Methods for Total Antioxidant Capacity and its Main Contributors Determination: A review. *Open Chem*. 2015. Vol. 13 (1), pp. 824-56.
32. Brainina Kh.Z., Varzakova DP, Gerasimova E.L. Chronoamperometric method for determination of integral antioxidant activity. *Journal of Analytical Chemistry = Zhurnal analiticheskoy himii*. 2012. Vol. 67 (4), pp. 409-15 [In Russ.].
33. Brainina Kh.Z., Alyoshina L.V., Gerasimova E.L.; et al. New Electrochemical Method of Determining Blood and Blood Fractions Antioxidant Activity. *Electroanalysis*. 2009. Vol. 21 (3-5), pp. 618-24.
34. Brainina K.Z., Gerasimova E.L., Varzakova D.P.; et al. Potentiometric method for evaluating the Oxidant/Antioxidant activity of seminal and follicular fluids and clinical significance of this parameter for human reproductive function. *Open Chemical and Biomedical Methods Journal*. 2012. Vol. 5, pp.1-7.
35. Agarwal A., Roychoudhury S., Sharma R.; et al. Diagnostic application of oxidation-reduction potential assay for measurement of oxidative stress: Clinical utility in male factor infertility. *Reproductive BioMedicine Online*. 2016. Vol. 34(1), pp. 48-57.
36. Brainina Kh., Galperin L., Gerasimova E., Khodos M. Noninvasive Potentiometric Method of Determination of Skin Oxidant/Antioxidant Activity. *IEEE Sensors Journal*. 2012. Vol. 12 (3), pp.527-32.
37. Brainina Kh.Z., Gerasimova E.L., Varzakova D.P.

39. Ghanbari Kh., Hajheidari N. ZnO–Cu_xO/polypyrrole nanocomposite modified electrode for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, and uric acid. *Analytical Biochemistry*. 2015; 473: 53–62.
40. Ferreira R.Q., Avaca L.A. Electrochemical Determination of the Antioxidant Capacity: The Ceric Reducing/Antioxidant Capacity (CRAC) Assay. *Electroanalysis*. 2008; 20 (12): 1323-29.
41. Korotkova E.I., Karbainov Y.A., Shevchuk A.V. Study of antioxidant properties by voltammetry. *J. Electroanal. Chem.* 2002; 518 (1): 56-60.
42. Бюриков В.В. Особенности определения концентрации антиоксидантов амперометрическим методом. *Химия растительного сырья*. 2013; 3: 169-72.
43. Ziyatdinova G.K., Budnikov H.C., Pogorel'tzev V.I., Ganeev T.S. The application of coulometry for total antioxidant capacity determination of human blood. *Talanta*. 2006; 68 (3): 800-5.
44. Agarwal A., Roychoudhury S., Bjugstad K. B., Chak-Lam Cho. Oxidation-reduction potential of semen: what is its role in the treatment of male infertility? *Ther Adv Urol*. 2016; 8 (5): 302–318.
45. Brainina Kh.Z., Ivanova A.V., Sharafutdinova E.N., Lozovskaya E.L., Shkarina E.I. Potentiometry as a method of antioxidant activity investigation. *Talanta*. 2007; 71 (1): 13-8.
46. Brainina Kh.Z., Zaharov A. S., Vidrevicha M. B. Potentiometry for the determination of oxidant activity. *Anal. Methods*. 2016; 8 (28): 5667–75.
47. Allen J. Bard, eds. *Standard potentials in aqueous solution* New York: Marcel Dekker INC; 1985.
48. Augusto O. ABCs of Reactive Nitrogen Species and their Scavengers. In: *Sunrise Free Radical School: Back to the Basics SFRBM*, 2009. Available at: <http://sfrbm.org/site/assets/documents/frs/Augusto.pdf>.
49. Брайнина А.З., Иванова А.В., Шарафутдинова Е.Н. Оценка антиоксидантной активности пищевых продуктов методом потенциометрии. *Известия высших учебных заведений. Пищевая технология*. 2004; 4: 73-5.
- Noninvasive method of determining skin antioxidant/oxidant activity: clinical and cosmetics applications. *Anal. Bioanal. Electrochem.* 2013. Vol. 5 (5), pp. 528-42.
38. Agarwal A., Sharma R., Roychoudhury S.; et al. MiOXSYS: a novel method of measuring oxidation reduction potential in semen and seminal plasma. *Fertil Steril*. 2016. Vol. 106 (3), pp. 566-73.
39. Ghanbari Kh., Hajheidari N. ZnO–Cu_xO/polypyrrole nanocomposite modified electrode for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, and uric acid. *Analytical Biochemistry*. 2015. Vol. 473, pp. 53–62.
40. Ferreira R.Q., Avaca L.A. Electrochemical Determination of the Antioxidant Capacity: The Ceric Reducing/Antioxidant Capacity (CRAC) Assay. *Electroanalysis*. 2008. Vol. 20 (12), pp. 1323-29.
41. Korotkova E.I., Karbainov Y.A., Shevchuk A.V. Study of antioxidant properties by voltammetry. *J. Electroanal. Chem.* 2002. Vol. 518 (1), pp. 56-60.
42. Бюриков В.В. Features of the determination of the concentration of antioxidants by the amperometric method. *Chemistry of plant raw materials = Himija rastitel'nogo syr'ja*. 2013. Vol. 3, pp. 169-72 [In Russ.].
43. Ziyatdinova G.K., Budnikov H.C., Pogorel'tzev V.I.; et al The application of coulometry for total antioxidant capacity determination of human blood. *Talanta*. 2006. Vol. 68 (3), pp. 800-5.
44. Agarwal A., Roychoudhury S., Bjugstad K. B.; et al. Oxidation-reduction potential of semen: what is its role in the treatment of male infertility? *Ther Adv Urol*. 2016. Vol. 8 (5), pp. 302–318.
45. Brainina Kh.Z., Ivanova A.V., Sharafutdinova E.N.; et al. Potentiometry as a method of antioxidant activity investigation. *Talanta*. 2007. Vol. 71 (1), pp. 13-8.
46. Brainina Kh. Z., Zaharov A. S., Vidrevicha M. B. Potentiometry for the determination of oxidant activity. *Anal. Methods*. 2016. Vol. 8 (28), pp. 5667–75.
47. Allen J. Bard, eds. *Standard potentials in aqueous solution* New York: Marcel Dekker INC; 1985.
48. Augusto O. ABCs of Reactive Nitrogen Species and their Scavengers. In: *Sunrise Free Radical School: Back to the Basics SFRBM*, 2009. Available at: <http://sfrbm.org/site/assets/documents/frs/Augusto.pdf>.
49. Brainina A.Z., Ivanova A.V., Sharafutdinova E.N. Evaluation of the antioxidant activity of food products by potentiometry [Ocenka antioksidantnoj aktivnosti pishhevyyh produktov metodom potenciometrii]. *News of institutions of higher education. Food technology. Izvestiya Vysshikh Uchebnykh Zavedeniy. Pishhevaya tehnologija*. 2004. Vol. 4, pp. 73-5, [In Russ.].

Авторы

Ходос Марк Яковлевич
Уральский государственный экономический университет
Доктор химических наук, старший научный сотрудник,
директор научно-инновационного центра сенсорных технологий
Российская Федерация, 620144, г. Екатеринбург, ул. 8
Марта/Народной Воли, 62/45
hdm@usue.ru

Казаков Ян Евгеньевич

АО «Медицинские технологии»
Кандидат медицинских наук, врач-терапевт
Российская Федерация, 620075, г. Екатеринбург, ул.
Кузнечная, 83
yankaz@yandex.ru

Видревич Марина Борисовна

Уральский государственный экономический университет
Кандидат химических наук, доцент, доцент
Российская Федерация, 620144, г. Екатеринбург, ул. 8
Марта/Народной Воли, 62/45
mbv@usue.ru

Брайнина Хьена Залмановна

Уральский государственный экономический университет
Доктор химических наук, профессор, научный руководи-
тель научно-инновационного центра сенсорных тех-
нологий.
Российская Федерация, 620144, г. Екатеринбург, ул. 8
Марта/Народной Воли, 62/45
baz@usue.ru

Authors

Mark Ya. Khodos
Ural State University of Economics
Dr.Sci. (Chemistry), Senior Researcher, Director of the
Research and Innovation Center for Sensory Technologies
62, 8th of March Str., Yekaterinburg, Russian Federation,
620219
hdm@usue.ru

Yan E. Kazakov

Joint Stock Co «Medical technologies»
Cand.Sci. (Med.), Physician.
83, Kuznetchnaya Str., Yekaterinburg, Russian Federation,
620075
yankaz@yandex.ru

Marina B.Vidrevich

Ural State University of Economics
Cand. Sci. (Chemical), Associate professor
62, 8th of March Str., Yekaterinburg, Russian Federation,
620219
mbv@usue.ru

Khiena Z. Brainina

Ural State University of Economics
Dr.Sci.(Chemistry), Professor, Research Supervisor of the
Research and Innovation Center for Sensory Technologies
62, 8th of March Str., Yekaterinburg, Russian Federation,
620219
baz@usue.ru